

(19) **KG** (11) **242** (13) **C2**(51)⁶ **C07D 411/04; C12P 41/00;
A61K 31/505**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ **к патенту Кыргызской Республики**

(21) 940209.1

(22) 31.10.1994

(31) 1.9009861.7

(32) 02.05.1990

(33) GB

(46) 30.09.1998, Бюл. №3, 1998

(86) PCT GB 91/00706 (02.05.1991)

(71)(73) Биокем Фарма Инк. (СА)

(72) Джонатан Алан Виктор Коутс, Ян Мартин Маттн, Чарльз Ричард Пени, Ричард Сторер, Кристофер Уильямсон (GB)

(56) А.с. SU №174433, кл. А61К 31/505, 1985

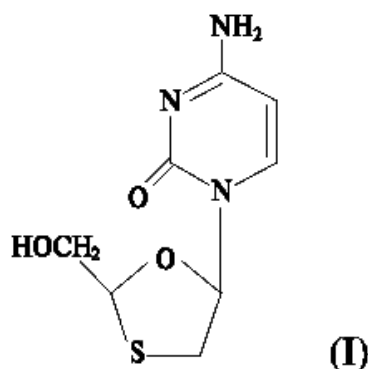
Патент US №4629729, кл. А61К 31/505, 1986

(54) (-)-Энантиомер цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1Н)-пиримидин-2-она в существенно чистом виде или фармацевтически приемлемые его производные, смесь(-)-энантиомера и (+)-энантиомера, способы их получения, противовирусная композиция и способ лечения млекопитающих, включая человека, страдающих от вирусной инфекции или восприимчивых к ней

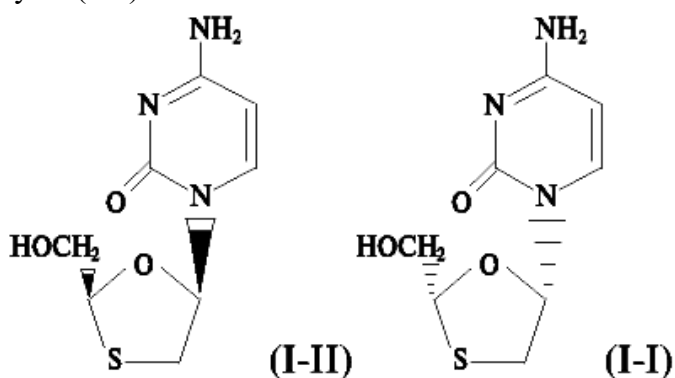
(57) Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности, к нуклеозидным аналогам 1,3-оксатиолана и может быть использовано против вирусных инфекций. Обнаружено, что (-)-энантиомер 1,3-оксатиолана обладает существенно более низкой токсичностью, чем (+)-энантиомер. Описаны производные 1,3-оксатиолана нуклеозида, фармацевтические смеси на их основе, способы их получения и способы лечения. 5 н.п., 13 з.п. ф-лы, 3 табл., 13 пр.

Настоящее изобретение относится к нуклеозидным аналогам и их использованию в медицине. Более конкретно, настоящее изобретение относится к нуклеозидным аналогам 1,3-оксатиолана, фармацевтическим составам на их основе и их использованию при лечении вирусных инфекций.

Соединение формулы I



также известно под маркой BCH-189 или NGPB-21 и было описано как соединение, обладающее противовирусной активностью, в частности, как средство против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), являющегося причиной СПИД (5th Anti-AIDS conference, Montreal, Canada 5th - 9th June 1989: Abstracts T.C. O.I. and M.C.P. 63: European Patent Application No. 038562). Соединение формулы (I) это - рацемат двух энантиомеров формулы (I-I) и формулы (I-II):



и было описано и исследовано в форме рацемата. В настоящее время только соединение 3-азидо-3-дезокситимидин (А Z т, зидовудин, BW 509) апробировано в качестве препарата для лечения заболеваний, спровоцированных ВИЧ. Однако это соединение обладает значительным побочным действием и поэтому либо не может быть использовано, или, будучи однажды использованным, может привести к нежелательным последствиям. В связи с этим существует постоянная потребность в создании соединений, которые были бы эффективны против ВИЧ и в то же время обладали бы значительно лучшим терапевтическим индексом.

К нашему удивлению недавно мы обнаружили, что оба энантиомера соединения формулы (I) обладают равным действием против ВИЧ, но один из энантиомеров (-)-энантиомер) обладает существенно более низкой цитотоксичностью, чем другой энантиомер. Таким образом, возникает первый аспект настоящего изобретения - обеспечивается (-) /или левовращающий/ энантиомер соединения формулы (I) и фармацевтически приемлемые соединения на его основе.

Химическая формула (-) энантиомера представлена следующим образом: (-)-цис-4-амино-1-/2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил-(1H)-пириимидин-2-он (далее - соединение А). Он абсолютно стереохимичен с соединением формулы (I-I), формула которого (2R, цис)-4-амино-1-/2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил/-(1H)-пириимидин-2-он.

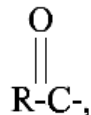
Предпочтительно, когда обеспечивается создание преимущественно свободного от соответствующего (+) - энантиомера соединения А, т.е. когда это соединение А содержит не более 5 вес./вес. % (+) - энантиомера, а более предпочтителен вариант, когда количество (+) энантиомера не превышает примерно 2 вес./вес. %, и самый оптимальный вариант, когда он присутствует в количестве примерно менее 1 вес./вес. %.

Под фармацевтически приемлемыми производными подразумевают любые фармацевтически приемлемые соли, эфиры или соли таких эфиров соединения А или любого другого соединения, которое при введении реципиенту способно выделить (прямо

или опосредованно) соединение А при противовирусный активный метаболит или остаток на основе этого соединения.

Специалисты в данной области понимают, что соединение А может быть модифицировано с целью создания фармацевтически приемлемых производных на его основе, за счет функциональных групп как пиримидинового основания, так и за счет оксиметильной группы оксатиоланового кольца. Модификации за счет всех этих функциональных групп включаются в рамки настоящего изобретения. Однако особый интерес представляют фармацевтически приемлемые производные, полученные путем модификации 2-оксиметильной группы оксатиоланового кольца.

Предпочтительные эфиры соединения А включают соединения, в которых атом водорода 2-гидроксиметильной группы замещается ацильной функциональной группой



в которой некарбонильная группировка R эфира выбрана из группы: водород, линейный или разветвленный алкил (например, метил, этил, н-пропил, трет-бутил, н-бутил), алкоксиалкил (например, метоксиметил), аралкил (например, бензил), арилоксиалкил (например, феноксиметил), арил (например, фенил, возможно замещенный галогеном, C₁₋₄ - алкилом или C₁₋₄ - алкоксилем); сульфоновые эфиры (например, алкил- или аралкилсульфонил, например, метансульфонил); эфиры аминокислот (например, L-валил или L-изолейцил), а также моно-, ди-или трифосфаты.

Что касается вышеописанных эфиров, то если отсутствует другая спецификация, любая представленная алкильная группировка преимущественно содержит 1-16 атомов углерода, в частности 1-4 атома углерода. Любая арильная группировка, представленная в таких эфирах, преимущественно включает фенильную группу.

В частности, эфирами могут быть C₁₋₁₆ - алкиловые эфиры, незамещенный бензиловый эфир или бензиловый эфир, замещенный, по крайней мере, одним атомом галогена (бромом, хлором, фтором или йодом), C₁₋₆ - алкилом, C₁₋₆ - алкокси, нитро или трифторметильной группой.

Фармацевтически приемлемые соли соединения А включают те, которые получены из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований. К подходящим кислотам относятся, например, хлористоводородная, бромистоводородная, серная, азотная, перхлорная, фумаровая, малеиновая, фосфорная, гликолевая, молочная, салициловая, янтарная, паратолуолсульфовинная, уксусная, лимонная, метансульфо-, муравьиная, бензойная, малоновая, нафталин-2-сульфо-, и бензолсульфокислоты. Другие кислоты, такие как, щавелевая, хотя сами по себе фармацевтически неприемлемы, могут быть использованы как посредники при получении соединений настоящего изобретения и их фармацевтически приемлемых кислых солей присоединения.

Соли, полученные из соответствующих оснований, включают щелочные металлы (например, натрий), щелочноземельные металлы (например, магний), аммоний, + и NR₄⁺, (где R-C₁₋₄ - алкил).

Следующие здесь далее ссылки на соединения, соответствующие данному изобретению, включают и соединения А и его фармацевтически приемлемые производные.

Соединения данного изобретения либо сами по себе обладают противовирусной активностью, либо переходят в таковые в процессе метаболизма. В частности, эти соединения эффективны при ингибировании репликации ретровирусов, включая ретровирусы человека, такие как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), являющийся причиной СПИДа.

Таким образом, здесь обеспечивается еще один аспект изобретения - соединение А или его фармацевтически приемлемое производное предлагается использовать в качестве активного терапевтического средства, в частности, в качестве противовирусного средства,

например, при лечении ретровирусных инфекционных заболеваний.

Еще одним или альтернативным аспектом в данном изобретении является обеспечение способа лечения вирусных инфекционных заболеваний, в частности, заболеваний, причиной которых является ретровирус, такой как ВИЧ, как у животных, так и человека, способа, который включает введение эффективного количества соединения А или его фармацевтически приемлемого производного.

В данном изобретении также обеспечивается использование соединения А или его фармацевтически приемлемого производного для производства медикамента для лечения вирусного заболевания.

Соединения настоящего изобретения также полезны при лечении осложнений, вызванных СПИД, таких как: СПИД-ассоциированный комплекс (ARC), прогрессирующая генерализованная лимфаденопатия (PGL), СПИД - ассоциированные осложнения нервной системы (такие как тропический парапарез или слабоумие (деменция)), анти-ВИЧ - серопозитивные и ВИЧ-положительные осложнения, саркома Капоши, тромбоцитопеническая пурпура и ассоциированные инфекционные заболевания, например, пневмоцистоз *Pneumocystis carinii*.

Соединения настоящего изобретения также полезны в предотвращении прогрессии клинических заболеваний индивидуумов, анти-ВИЧ-сероположительных или ВИЧ-антиген положительных, а также в профилактике последующей устойчивости к ВИЧ.

Соединение А или его фармацевтически приемлемые производные могут быть также использованы для предотвращения загрязнения вирусом физиологических жидкостей, таких как кровь или семенная жидкость *in vitro*.

Специалистам, работающим в данной области понятно, что термин "лечить" здесь распространяется и на профилактику, а также на лечение установившихся инфекционных заболеваний или симптомов.

Кроме того, понятно, что количество соединения А данного изобретения, которое необходимо для лечения может варьироваться не только в зависимости от соединения, выбранного для лечения, но также от способа его введения, природы заболевания, которое необходимо лечить, возраста и состояния больного, и может быть, в конце концов, предоставлено на усмотрение врача или ветеринара. Однако, как правило, подходящая доза может находиться в интервале от, примерно, 0.1 до, примерно, 750 мг/кг массы тела в сутки, предпочтительно - в интервале от примерно 0.5 до 60 мг/кг/сутки, наиболее предпочтительно, от 1 до 20 мг/кг/сутки.

Необходимая доза может обычно вводиться за один раз или же может осуществлено дробное введение через соответствующие интервалы, например необходимое количество вводимого препарата может быть разбито на две, три, четыре или более суб-доз в сутки.

Соединение удобно вводить в единицах лекарственной формы, содержащей, например, от 10 до 1500 мг, обычно от 20 до 1000 мг, и более удобно, когда содержится от 50 до 700 мг активного ингредиента на единицу лекарственной формы.

В идеальном варианте активный ингредиент следует вводить в таком количестве, чтобы пик концентрации активного ингредиента в плазме составлял, примерно, от 1 до 75 μM , предпочтительно от, примерно, 2 до 50 μM , а наиболее предпочтительно от, примерно, 3 до, примерно, 30 μM . Такое состояние может быть достигнуто, например, при внутривенных инъекциях 0.1-5 % раствора активного ингредиента, возможно в физиологическом растворе, или при оральном приеме в виде шариков, содержащих, примерно, от 1 до, примерно, 100 мг активного ингредиента. Желательный уровень в крови может поддерживаться при непрерывной инфузии, обеспечивающей, примерно, от 0.01 до, примерно, 5.0 мг/кг/час или при периодическом внутривенном вливании, содержащем, примерно, от 0.4 до, примерно, 15 мг/кг активного ингредиента.

Хотя можно вводить соединение данного изобретения и само по себе, однако предпочтительно, когда оно вводится в виде активного ингредиента фармацевтического

препарата.

Таким образом, данное изобретение обеспечивает еще и фармацевтический препарат, содержащий соединение А или фармацевтически приемлемое производное данного соединения вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями и, возможно, другими терапевтическими и/или профилактическими ингредиентами. Носитель(и) должен быть "приемлем" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава препарата и не отравлять реципиента, который принимает этот препарат.

Фармацевтические составы (препараты) могут находиться в лекарственных формах, подходящих для перорального, ректального, назального, местного (включая трансбуккальный и подязычный) ингаляционного или парентерального (включая внутримышечный, подкожный и внутривенный) способов введения или в форме, подходящей для ингаляции или вдыхания. Препараты могут, когда это бывает удобным, представлены в виде дискретных единиц лекарственных форм и могут быть получены любым из методов, хорошо известных специалистам в области фармации. Все вышеперечисленные методы включают стадию смешения активного соединения с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или с теми и другими, если в этом возникает необходимость, введение продукта в желаемый состав.

Фармацевтические составы (препараты), подходящие для перорального введения, могут обычно выпускаться в виде капсул, крахмальных облаток или таблеток, каждая из которых содержит предварительно рассчитанное количество активного ингредиента; в виде порошков или гранул; в виде раствора, суспензии или эмульсии. Активный ингредиент может быть также выпущен в виде шариков, паст или лекарственной каши. Таблетки и капсулы для перорального введения могут содержать традиционные добавки, такие как: связующие средства, смазки, дезинтеграторы или смачивающие средства. Таблетки могут иметь покрытие, наносимое хорошо известными специалистами методами. Жидкие пероральные препараты могут быть, например, в форме водных или масляных суспензий, растворов, эмульсий, сиропов, эликсиров, или могут выпускаться в виде сухого продукта, который может быть разбавлен водой или другим подходящим разбавителем перед употреблением. Такие жидкие препараты для перорального введения могут содержать традиционные добавки типа суспендирующих средств, эмульгаторов, неводных разбавителей (которые могут включать съедобные масла) или консерванты.

Соединения, соответствующие настоящему изобретению, могут также использоваться в форме для парентерального введения /инъекций, например, болезненные инъекции или непрерывные инфузии/ и могут быть выпущены в виде ампул, предварительно заполненных шприцев, небольших инфузионных объемов или во флаконах, содержащих многократные дозы с добавленными туда консервантами. Композиции могут быть в таких формах, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных разбавителях, и могут содержать дополнительные компоненты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В альтернативном варианте препарат для инъекций или инфузии может быть выпущен в виде порошка, который получают в асептических условиях из стерильного твердого продукта или путем лиофилизации из раствора. Этот порошок затем перед употреблением разбавляют подходящим разбавителем, например, стерильной, апиrogenной водой.

Для местного нанесения на кожу соединения, соответствующие настоящему изобретению, могут быть приготовлены в виде мазей, кремов или лосьонов, или в виде трансдермальной облатки (пластыря). Мази и кремы могут быть, например, созданы на водной или масляной основе с добавлением подходящих загустителей и/или желирующих средств. Лосьоны могут быть созданы на водной или масляной основе, и могут также содержать один или более эмульгирующих средств, суспендирующих средств, загустителей или красящих добавок.

Составы, пригодные для местного введения в полость рта, включают лепешки,

содержащие активный ингредиент в ароматизированной основе, обычно это бывает сахароза и гуммиарабик или трагакант; пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или сахароза и гуммиарабик; воду для полоскания рта, содержащую активный ингредиент в подходящем жидком носителе.

Фармацевтические препараты, пригодные для ректального введения, в которых носитель - твердое вещество, наиболее предпочтительно готовить в виде суппозиториев. Подходящими носителями будут масло какао и другие материалы, обычно используемые для этих целей специалистами, а суппозитории обычно можно формировать путем смешения активного соединения с размягченным или расплавленным носителем, после чего полученную смесь охлаждают и формуют из нее суппозитории.

Препараты, подходящие для введения во влагалище могут быть приготовлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спреев, содержащих в дополнение к активному ингредиенту подходящие носители, которые хорошо известны специалистам.

Для введения внутриназально соединения настоящего изобретения могут выпускаться в форме спреев, диспергируемых порошков или в форме капель.

Капли могут быть приготовлены на водной или неводной основе, также содержащей один или более диспергирующих средств, солюбилизующих средств или суспендирующих средств. Жидкие спреи обычно поставляют в баллончиках, находящихся под давлением.

Для проведения ингаляций соединения, соответствующие настоящему изобретению, обычно доставляют из инсулятора (порошковдувателя), аэрозольного ингалятора или упаковки, находящейся под давлением или любыми другими традиционными средствами доставки аэрозольных спреев. Упаковки, находящиеся под давлением, могут содержать подходящий распылитель, такой, как дихлордифторметан, диоксид углерода, трихлортрифторметан, дихлортетрафторэтан и другие подходящие газы. В случае сжатого аэрозоля дозировка может осуществляться за счет клапана, подающего отмеренное количество.

В альтернативном варианте, для введения препарата путем ингаляции или инсуляции, соединения, соответствующие настоящему изобретению, могут быть представлены в виде сухих порошковых композиций, например, порошковой смеси соединения и подходящего основания типа лактозы или крахмала. Порошковая композиция может быть выпущена, например, в виде капсул или патронов или, например, в виде желатиновых или блистерных упаковок, из которых порошок может быть введен с помощью ингалятора или инсулятора.

В случае необходимости вышеописанные препараты адаптируют таким образом, чтобы обеспечить постепенное освобождение активного ингредиента и постоянную его доставку в организм.

Фармацевтические препараты, соответствующие данному изобретению, могут также содержать другие активные ингредиенты, такие как противомикробные средства или консерванты.

Соединения данного изобретения могут быть также использованы в сочетании с другими лекарственными средствами, например, с другими противомикробными средствами. В частности, соединения данного изобретения могут быть использованы вместе с известными противовирусными средствами.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает комбинацию, содержащую соединение А или физиологически приемлемое производное этого соединения, а также терапевтически активное средство, в частности, противовирусное средство.

Комбинации, о которых шла речь выше, можно представить в форме фармацевтического препарата для использования и такие фармацевтические препараты, содержащие комбинацию, определенную выше, вместе с фармацевтически приемлемым носителем составляют еще один аспект настоящего изобретения.

Подходящие терапевтические средства для использования в таких комбинациях

включают ациклические нуклеозиды, такие как ацикловир или ганцикловир, интерфероны, такие как α , β , или γ - интерферон, ингибиторы почечной экскреции, такие как пробенецид, ингибиторы транспорта нуклеозидов, такие как дипиридамо, 2,3-дидеоксинуклеозиды, такие как AZT, 2,3-дидеоксицитидин, 2,3-дидеоксиаденозин, 2,3-дидеоксинозин, 2,3-дидеокситимедин, 2,3-дидеокси-2,3-дидегидротимидин и 2,3-дидеокси-2,3-дидегидроцитидин, иммуномодуляторы, такие как интерлейкин-2 (IL2) и колониестимулирующий фактор гранулоцитарного макрофага (КСФ МГ), эритропоэтин, амплиген, тимомодулин, тимопентин, фоскарнет, рибавирин и ингибиторы ВИЧ-связывания с CD-4 рецепторами, например, растворимыми CD-4, фрагментами CD-4, CD-4 гибридными молекулами (CD-4-антигенный маркер хелперных Т-лимфоцитов), ингибиторы гликозилирования, такие как 2-деокси-D-глюкоза, кастаноспермин и 1-деоксиноджиримицин.

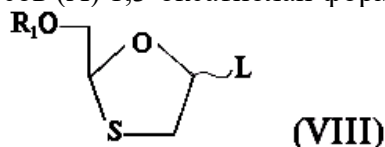
Индивидуальные компоненты таких комбинаций можно вводить либо последовательно, либо одновременно, в раздельном или вместе в объединенном фармацевтическом препарате.

В тех случаях, когда соединение А или фармацевтически приемлемое производное этого соединения используется в комбинации со вторым терапевтическим средством, активным в отношении того же вируса, доза каждого соединения может быть либо такой же, как в тех случаях, когда соединение используется одно.

Соединение А и его фармацевтически приемлемые соединения могут быть получены способами, известными специалистам в данной области, для получения соединений аналогичной структуры, например, как описано в Европейской патентной заявке №0382562.

Специалистам в данной области должно быть понятно, что для некоторых методов, описанных здесь ниже, требуемая стереохимическая структура соединения А может быть получена либо, если в качестве исходного материала берется оптически исходный материал, или путем растворения рацемической смеси на любой подходящей стадии синтеза. В случае всех процессов оптически чистый требуемый продукт может быть получен путем растворения конечного продукта каждой реакции.

В одном из таких процессов (А) 1,3-оксатиолан формулы (VIII)



в которой аномерная группа L является замещаемой группой, подвергается взаимодействию с соответствующим основанием. Подходящие группы L включают -OR, где R-алкильная группа, например, C₁₋₆ - алкильная группа, такая как метильная группа или R представляет ацильную группу, например, C₁₋₆- ацильная группа, такая как ацетил или галоген, например, йод, бром или хлор.

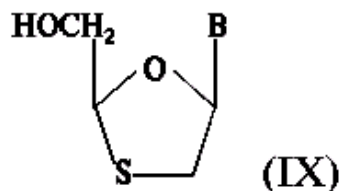
Соединение формулы VIII преимущественно взаимодействует с предшественником пиримидинового основания (предварительное силилированное основание таким силилирующим средством, как гексаметилдисилазан) или цитозином в подходящем растворителе, таком как метилхлорид, с использованием кислоты Льюиса, такой как тетрагидрид титана, олова IV, соединения, например SnCl₄ или триметилсилилтрифлат.

1,3-оксатиолан формулы (VIII) может быть получен, например, при взаимодействии альдегида формулы (VII) с меркаптоацеталем формулы (VI) в подходящем органическом растворителе, таком как толуол в присутствии кислотного катализатора, например, кислоты Льюиса, такой как хлорид цинка. (HSC₂H₅ (OC₂H₅)₂- формула (VI) и C₆H₅CO₂OH₂CHO-формулы (VII))

Меркаптоацетали формулы (VI) могут быть получены способами, которые известны специалистам в данной области, например, G. Hesse и I. Jorder, *Chem. Ber.* 85, 924-932 (1952).

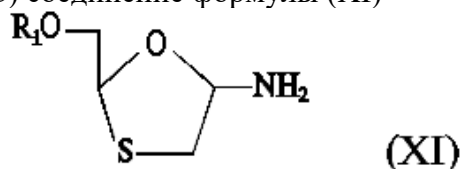
Альдегиды формулы (VII) могут быть получены согласно известным методам, например, E.G. Halloquist и H. Hibbert, Can. J. Research, 8, 129-136 (1933). Преимущественно неочищенный альдегид (VII) может быть очищен путем превращения в кристаллический бисульфитный аддукт присоединения с последующим восстановлением этого аддукта в свободный альдегид.

Во втором процессе (B) соединения А получают путем интерконверсии соединения формулы (IX)



в которой В - представляет основание, превращаемое в цитозин. Такая интерконверсия может быть осуществлена либо путем простой химической трансформации (например, конверсии урацила в цитозин), или путем ферментативного превращения с использованием деоксирибозилтрансферазы. Такие способы и условия для интерконверсии основания хорошо известны специалистам в области химии нуклеозидов.

В третьем процессе (C) соединение формулы (XI)



может быть превращено в соединение А путем конверсии аномерной NH₂ группы в цитозиновое основание способами, хорошо известными специалистам в химии нуклеозидов.

В большинстве реакций, описанных здесь выше, сообщалось в контексте нуклеозидного синтеза, например, в книге "Аналоги нуклеозидов - Химия, Биология и Применение в медицине." - R.T. Walker et.al., eds, Plenum Press, New York (1979), с. 165-192; T. Ueda в работе "Химия нуклеотидов", т. 1, L. B. Townsend ed., Plenum Press, New York (1988) с. 165-192.

Следует понять, что выше приведенные реакции для своего осуществления могут нуждаться в использовании исходных материалов, имеющих защищенные функциональные группы, и вследствие этого может понадобиться либо на промежуточной, либо на конечной стадии снятие защитной группы для получения необходимого соединения. Защита и снятие защиты функциональных групп может осуществляться с использованием традиционных методов. Так, например, аминогруппы могут быть защищены группой, выбранной из следующей группы: аралкил (например, бензил), ацил, арил, (например, 2,4 динитрофенил) или силил; последующее удаление защитной группы осуществляется, если это необходимо, путем гидролиза или гидрогенолиза в подходящих стандартных условиях. Гидроксильная группа может быть защищена с использованием любых традиционных гидроксилзащитных групп, например, описанных в книге "Защитные группы в органической химии", Ed. J.F.W. McOmie (Plenum Press, 1973) или "Защитные группы в органическом синтезе" Theodora W. Greene (John Wiley and Sons, 1981) К подходящим гидроксилзащитным группам относятся, например, алкил (например, метил, трет-бутил или метоксиметил), аралкил (например, бензил, дифенилметил или трифенилметил), гетероциклические группы, такие как тетрагидропиранил, ацил (например, ацетил или бензоил) и силильные группы, такие как триалкилсилил, например, трет-бутилдиметилсилил. Гидроксилзащитающие группы могут быть удалены традиционными способами. Так, например, алкил, силил, ацил и гетероциклические защитные группы можно удалить путем сольволиза, например, при гидролизе в присутствии кислоты или основания. Аралкильные защитные группы могут

быть удалены, например, такие как трифенилметил, аналогично путем сольволиза, например, путем гидролиза в кислой среде. Такие аралкильные группы, как бензил, можно отщепить, например, путем обработки BF_3 /эфиром и уксусным ангидридом с последующим удалением образующихся при этом ацетатных групп не соответствующей стадии синтеза. Сильные группы можно удалить, используя для этих целей источник фторидионов, такой как тетра-н-бутиламмоний фторид.

В предыдущих процессах соединение А, как правило, получают в виде смеси цис- и транс-изомеров, из которых цис-изомер представляет интерес.

Эти изомеры могут быть разделены физическими методами, например, путем хроматографирования на силикагеле, или путем фракционной кристаллизации, с использованием либо непосредственно самого соединения или подходящего производного этого соединения, например, ацетатов (полученных, например, при взаимодействии с уксусным ангидридом), которые затем возвращают после разделения в исходный продукт (например, путем деацетилирования в метанольном растворе аммиака).

Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения могут быть получены в соответствии с описанием, приведенным в патенте US №4, 383, 114, раскрытие которого дается здесь как ссылка. Так, например, когда хотят получить кислую соль присоединения соединения А, продукт из любого вышеприведенного способа может быть превращен в соль путем обработки полученного свободного основания подходящей кислотой с использованием традиционных методов. Фармацевтически приемлемые кислые соли присоединения могут быть получены при взаимодействии свободного основания с соответствующей кислотой возможно в присутствии подходящего растворителя, такого как эфир (например, этилацетата) или спирта (например, этанола, метанола или изопропанола). Неорганические основные соли могут быть получены при взаимодействии исходного соединения с подходящим основанием, таким как алкоксид, (например, метоксид натрия) возможно в присутствии растворителя (такого как спирт, например, метанол). Фармацевтически приемлемые соли могут быть также получены из других солей, включая фармацевтически приемлемые соли, соединения А с использованием стандартных методов.

Соединение А может быть превращено в фармацевтически приемлемый фосфат или другую соль (эфир) при взаимодействии с фосфорилирующим соединением, таким как POCl_3 или подходящим этерифицирующим агентом, таким как галоидангидрид или ангидрид. Эфир или соль соединения А могут быть превращены в исходные соединения А путем гидролиза.

Разделение конечного продукта или промежуточного продукта, или исходного материала может быть осуществлено известными способами, описанными, например, "Стереохимия соединений углерода". - E. L. Eliel (McGraw Hill, 1962) и "Таблицы растворителей" S. H. Wilen.

Так, например, соединение А может быть получено методом хиральной ВЭЖХ с использованием подходящей стационарной фазы, например, ацетилированного β -циклодекстрина или триацетата целлюлозы и подходящего растворителя, например, спирта, такого как этанол, или водного раствора, например, триэтиламмонийацетата. В альтернативном варианте соединения могут быть разделены методом селективного энантио катаболизма, катализируемого ферментом, таким как цитидин-деаминаза, или путем селективной ферментативной деградации подходящего производного в присутствии 5'-нуклеотидазы. При разделении с использованием ферментативных методов, можно использовать раствор фермента или, более удобно, иммобилизованный фермент. Иммобилизация ферментов может быть осуществлена способами, хорошо известными специалистам в данной области, например, путем адсорбции на смоле, такой как Eupergit C.

Далее приводится описание данного изобретения, иллюстрируемое следующими примерами, которые ни коим образом не ограничивают рамки данного изобретения.

Промежуточный продукт 1.

5-метокси-1,3-оксатиолан-2-метанол-бензоат.

Раствор хлорида цинка (1.6 г) в горячем метаноле (15 мл) добавили при перемешивании к перемешиваемому раствору меркаптоацетальдегида, диметилацетата (34.2 г) и бензоилоксиацетальдегида (48.3 г) в толуоле (1300 мл). Затем полученный раствор нагревали с обратным холодильником в токе азота в течение 50 мин. Охлажденную смесь сконцентрировали, разбавили некоторым количеством толуола, затем отфильтровали через кизельгур. Соединенные фильтраты и толуол промыли насыщенным раствором водного бикарбоната натрия дважды и рассолом, высушили (MgSO_4) затем упарили до масла, которое пропустили через хроматографическую колонку, заполненную диоксидом кремния (2 кг, Merck 9385), проэлюировали хлороформом и получили озаглавленный продукт в виде масла (45.1 г), представляющего смесь аномеров (1:1); параметры ЯМР спектра (DMCO-d_6) δ 3.1-3.3 (4H), 3.42 (6H), 4.4-4.6 (4H), 5.41 (1H), 5.46 (1H), 5.54 (1H), 5.63 (1H), 7.46 (4H), 7.58 (2H), 8.07 (4H); γ макс (CHBr_3) 1717 cm^{-1} .

Промежуточный продукт 2.

\pm -цис-1-/2-бензоилоксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил-/1H/-пиримидин-2-4-дион.

Смесь тщательно измельченного урацила (9.62 г), гексаметил силазана (50 мл) и сульфата аммония (30 мг) нагрели с обратным холодильником в токе азота, нагревали до тех пор, пока раствор не стал прозрачным. Этот раствор охладили и затем упарили до образования бесцветного масла, которое затем растворили в атмосфере азота в ацетонитриле (50 мл). Раствор добавили к перемешиваемому охлажденному льдом раствору 5-метокси-1,3-оксатиолан-2-метанолбензоата (промежуточное соединение 1) (19.43 г) в ацетонитриле (600 мл) и добавили триметилсилилтрифторметансульфонат (14.7 мл). Удалили ледяную баню, и раствор нагревали в течение 45 мин в токе азота. После охлаждения и упаривания остаток очистили методом колоночной хроматографии, пропустив над 1 кг силикагеля Merck 9385 и, проэлюировав смесью хлороформ/метанол = 9:1. Нужные фракции охладили и упарили, получив в результате сырой остаток. Этот остаток подвергли фракционной кристаллизации из минимального количества горячего метанола (1200 мл), в результате получили озаглавленное соединение (6.32 г) в виде белых кристаллов. Параметры ЯМР спектра: (DMCO-d_6) δ 11.36 (1H, БС); 7.50-8.00 (6H, м); 6.20 (1H, т); 5.46 (2H), 4.62 (2H, м), 3.48 (1H, м), 3.25 (1H, м).

Промежуточное соединение 3

\pm -цис-4-амино-1-/2-бензоилоксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил-/1H/-пиримидин-2-он.

Метод (a).

Суспензию цитозина (20.75 г) и сульфата аммония (несколько мл) в гексаметилдисилазана (110 мл) перемешивали и нагревали с обратным холодильником в течение двух с половиной часов в токе азота. Растворитель удалили упариванием, а твердый остаток растворили в сухом ацетонитриле (350 мл). Этот раствор перенесли, используя гибкую иглу, в перемешиваемый, охлажденный льдом раствор 5-метокси-1,3-оксатиолан-2-метанол бензоата (промежуточное соединение 1) (43.57 г) в ацетонитриле (650 мл) в токе азота. Добавили триметилсилилтрифторметансульфонат (33 мл), раствору позволили нагреться до комнатной температуры (1.5 ч), затем в течение ночи нагревали с обратным холодильником. Оставшуюся смесь сконцентрировали, разбавили насыщенным водным раствором бикарбоната натрия (500 мл), затем проэкстрагировали этилацетатом (3x500 мл). Объединенные экстракты промыли водой (2x250 мл) и рассолом (250 мл), высушили над MgSO_4 , затем упарили до получения пены, которую пропустили через хроматографическую колонку, заполненную диоксидом кремния (600 г, Merck 7734), проэлюировали смесью этилацетата и метанола (в результате получили смесь аномеров (1:1 31.59 г). Смесь перекристаллизовали из воды (45 мл) и этанола (9.0 мл), в результате получили твердый остаток (10.23 г), который перекристаллизовали из этанола (120 мл) и воды (30 мл), в результате получили озаглавленный продукт в виде твердого вещества белого цвета (9.26 г); λ макс (MeOH) 229.4 мм ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 610); 272.4 мм ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 293);

параметры ЯМР спектра ^1H ЯМР ($\text{DMCO} - d_6$) δ 3.14 (1H), 3.50 (1H); 4.07 (2H); 5.52 (1H); 5.66 (1H); 6.28 (1H); 7.22 (2H); 7.56 (2H); 7.72 (2H); 8.10 (2H).

Метод (в).

Оксихлорид фосфата (7.0 мл) по каплям добавили к перемешиваемой льдом суспензии 1,2,4-триазола (11.65 г) в ацетонитриле (120 мл), затем, сохраняя температуру внутри реакционного сосуда ниже 15°C , по каплям добавили триэтиламин (22.7 мл). Через 10 мин медленно добавили раствор (\pm)-цис-1-(2-бензоилоксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2,4-диона (6.27 г) в ацетонитриле (330 мл). Затем перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение ночи. Затем смесь охладили на ледяной бане и медленно добавили триэтиламин (30 мл) вслед затем - воду (21 мл). Полученный раствор упарили, и остаток разделили между насыщенным раствором бикарбоната натрия (400 мл) и хлороформа (3 x 200 мл). Объединенные хлороформенные экстракты высушили над сульфатом магния, отфильтровали и упарили, в результате получили сырой остаток (9.7 г). Остаток растворили в 1,4-диоксане (240 мл) и добавили концентрированный раствор водного аммиака (0.880 г, 550 мл). Через 1.5 ч раствор упарили, и остаток растворили в метаноле. Эта процедура вызвала охлаждение твердого осадка, который отфильтровали. Маточный раствор пропустили через хроматографическую колонку, заполненную силикагелем (600 г, Merck 9385). Нужные фракции были собраны и упарены, в результате получили озаглавленное соединение в виде твердого вещества желтовато-коричневого цвета (2.81 г), идентичного соединению, полученному по методу (а).

\pm -цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-1H-пиримидин-2-он.

Суспензию (цис-4-амино-1-(2-бензоилоксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она (промежуточное соединение 3) (8.19 г) и Амберлитовой смолы IRA-400 (ОН) (8.24 г) в метаноле (250 мл) перемешивали и нагревали с обратным холодильником в течение 1 ч 15 мин. Твердые вещества отфильтровывали, затем промывали метанолом. Объединенные фильтраты упаривали. Остаток растерли с этилацетатом (80 мл). Полученный белый остаток отфильтровывали, в результате получили озаглавленный продукт (5.09 г), параметры ЯМР спектра ^1H ЯМР ($\text{DMCO}-d_6$) δ 3.04 (1H), 3.40 (1H), 3.73 (2H), 5.18 (1H), 5.29 (1H), 5.73 (1H), 6.21 (1H), 7.19 (2H), 7.81 (1H).

Пример 2.

Хиральное ВЭЖХ разделение энантиомеров \pm -цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она.

(А) 25 мг рацемического продукта примера (1) подвергли препаративной ВЭЖХ при следующих условиях:

Колонка: Merck Hibar триацетат целлюлозы, 250x10 мм, 10 μ .

Элюент: этанол

Скорость потока: 3 мл/мин

Детектор: УФ, 270 нм

Температура: комнатная.

После упаривания соответствующих собранных фракций получили 6.8 мг (около 100 %) (2R цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она и 3.6 мг (примерно 90 %) (2S, цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она.

(В) 26 мг рацемического продукта примера 1 подвергли препаративной ВЭЖХ при следующих условиях:

Колонка: ASTEC циклобонд 1 ацетил, 250x4.6 мм;

Элюент: 0.2 % ацетат триэтиламмония (получен добавлением ледяной уксусной кислоты к 0.2 % раствору триэтиламина в воде до финального pH=7.2);

Скорость потока: 2 мл/мин,

Детектор: УФ, 300 нм;

Температура: комнатная.

После упаривания соответствующих фракций получили неочищенный (2R цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он (25 мг) и неочищенный (2S, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он (17 мг). Эти фракции уже отдельно подвергли дальнейшей препаративной ВЭЖХ при следующих условиях:

Колонка: ASTEC циклобонд 1 ацетил, 250x4.6 мм;

Элюент: 15 mM ацетат аммония, pH=6.8;

Скорость потока: 0.5 мл/мин,

Детектор: УФ, 300 нм;

Температура: 5°C.

Упаривание соответствующих собранных фракций дало 5.0 мг (около 91 %) (2R, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она и 7.6 мг (около 96 %) (2S, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она.

Пример 3.

(-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он.

(i) \pm цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он, дигидрогенфосфат, аммониевая соль.

Холодную (0°C) перемешиваемую суспензию (\pm) -цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она (1.0 г) из примера 1 в сухом триметилфосфате (20 мл) обработали оксихлоридом фосфора (2.44 мл) и смесь перемешивали при 0°C в течение 35 мин, затем реакцию остановили в ледяной воде (60 г). Добавлением 1N водного раствора гидроксида натрия довели pH холодной смеси до значения 2.5, затем смесь пропустили через колонку, заполненную активированным углем (10 г, DARCO), которую проэлюировали сначала водой, потом смесью водный раствор аммиака - этанол. Фракции, содержащие сырой монофосфат объединили и сконцентрировали. Полученный раствор пропустили через колонку, заполненную DEAE Сефадексом А-25 (HCO₃⁻ - форма). Элюирование осуществляли в градиенте концентраций: вода (120 мл) до 0.1 M раствора NH₄HCO₃ (240 мл) затем 0.2, 0.3 и 0.4 M NH₄HCO₃ (120, 240 и 400 мл соответственно). Соответствующие фракции были объединены и сконцентрированы. Полученный раствор разбавили водой (40 мл) и высушили лиофильной сушкой, в результате получили озаглавленный продукт в виде твердого вещества белого цвета.

(1.37 г); λ , макс. (pH 6, буфер) 271 нм ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 190$); ¹H ЯМР (D₂O) δ 3.23 (1H), 3.55 (1H); 4.0-4.2 (2H), 5.43 (1H); 6.07 (1H), 6.33 (1H); 8.08 (1H).

(ii) (2R, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он и (2S, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он.

5-нуклеотидазу (из *crotalus atrox venom*) (ЕС 3.1, 3.5) (60 мг с содержанием 17 единиц /мг) добавили к раствору (\pm)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он, 6 дигидрофосфата, аммонийная соль (1.35 г) в буфере (30 мл), полученном из глицина (526 мг) и хлорида магния (190 мг) и воды (100 мл), и смесь выдержали при 37°C в течение 2.5 ч. Затем добавили еще 20 мг фермента и инкубацию продолжили еще в течение 3.5 ч. Эту смесь пропустили через колонку, заполненную DEAE Сефадексом А-25 (HCO₃⁻-форма). Элюирование провели водой (160 мл), затем 0.1, 0.2, 0.3 и 0.4 M NH₄HCO₃ (по 200 мл каждого раствора). Соответствующие фракции, содержащие первый элюируемый компонент, объединили и упарили, остаток подвергли хроматографированию на колонке, заполненной силикагелем (60 г Merck 7734), которую затем проэлюировали хлороформ-метанольными смесями. Упаривание соответствующих фракций из смеси метанол-этилацетат дало: 0.30 г (2R, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она в виде твердого вещества белого цвета: $[\alpha]_D^{21} + 137^\circ$ (с. 1.04 MeOH), ¹H ЯМР (DMSO) δ 3.04 (1H), 3.40 (1H), 3.73 (2H), 5.18 (1H), 5.29 (1H), 5.73 (1H), 6.21 (1H), 7.19 (2H), 7.81 (1H).

Соответствующие фракции, полученные на колонке из Сефадекса, содержащие второй элюируемый компонент, объединили и упарили. Остаток растворили в воде (30 мл), обработали щелочной фосфатазой (выделенной из *Escherichia coli*) (ЕС 3.1.3.1) (1.5 мл с 415 ед./мл), затем инкубировали при 37°C в течение часа. Растворитель удалили упариванием, и остаток пропустили через хроматографическую колонку, заполненную диоксидом кремния (60 г, Merck 7734), проэлюировали хлороформ-метанольными смесями. Упаривание соответствующих фракций из смеси метанол-этилацетат дало (2S, цис)-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он в виде твердого вещества белого цвета (0.32 г); $[\alpha]_D^{21}$ 132°; (с. 1.08 MeOH); 1H ЯМР (ДМСО) δ 3.04 (1H), 3.40 (1H), 3.73 (2H), 5.18 (1H), 5.29 (1H), 5.73 (1H), 6.21 (1H), 7.19 (2H), 7.81 (1H).

Пример 4.

(-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он.

(i) Три колбы объемом по 50 мл с питательным бульоном (Oxoid Ltd) инокулировали бактериальными петлями *Escherichia coli* (ATCC 23848), снятых с чашек с питательным агаром. Колбы инкубировали в течение ночи при 37°C при встряхивании с 250 об/мин, а затем содержимое каждой колбы было использовано для инокуляции 41 CDD среды (глутаминовая кислота 3 г/л; MgSO₄ 0.2 г/л; K₂SO₄ 2.5 г/л; NaCl 2.3 г/л; Na₂HPO₄ • 2H₂O 1.1 г/л; NaH₂PO₄ • 2H₂O 0.6 г/л; цитидин 1.2 г/л) в ферментере объемом семь литров. Ферментация культур проводилась при встряхивании 750 об/мин, 37°C с аэрацией 4 л/мин. После 24 часового выращивания клетки собрали путем центрифугирования (5000 г, 30 мин), выход составил 72 г влажной массы. Клеточные гранулы ресуспендировали в 300 мл 20 mM трис HCl буфера (pH 7.5) и разбили ультразвуком (4x45 секунд). Клеточный лом удалили центрифугированием (30.000 г, 30 мин), а белок (протеин) супернатантного слоя осадили добавлением NaCl 2.3 г/л; Na₂HPO₄ • 2H₂O 1.1 г/л; NaH₂PO₄ • 2H₂O 0.6 г/л; цитидин 1.2 г/л) в ферментере объемом семь литров. Ферментация культур проводилась при встряхивании 750 об/мин, 37°C с аэрацией 4 л/мин. После 24 часового выращивания клетки собирали путем центрифугирования (5000 г, 30 мин), выход составил 72 г влажной массы. Клеточные гранулы повторно суспендировали в 300 мл 20 mM трис HCl буфера (pH 7.5) и разрушали ультразвуком (4x45 секунд). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (30.000 г, 30 мин), а белок (протеин) супернатанта осаждали добавлением до сульфата аммония до 75 % насыщения. Осадок собрали путем центрифугирования (30.000 г, 30 мин) и гранулы ресуспендировали в 25 мл NEPES буфере (100 mM, pH 7.0), содержащем сульфат аммония (74 % насыщение). Раствор фермента получили путем центрифугирования (12.000 об/мин, 30 мин). Слой супернатантный слили, а гранулы растворили в трис-HCl буфере (100 mM, pH 7.0), доведя объем до первоначального.

(ii) Продукт примера 1 (115 мг) был растворен в воде (100 мл) и перемешан. К нему добавили раствор фермента (0.5 мл) и смесь выдерживали при постоянном pH за счет непрерывного добавления HCl (25 mM). Превращение контролировалось методом хиральной ВЭЖХ, которая показала, что происходило предпочтительное дезаминирование (+) энантиомера субстрата. Через 22 часа (+) энантиомер субстрата (RT 12.5 мин) был полностью выделен, и pH раствора довели до 10.5, добавляя концентрированный раствор гидроксида натрия.

Раствор, полученный выше, проэлюировали через колонку, заполненную QAE Sephadex (A 25; Pharmacia; 30x1.6 см) уравновешенную предварительно до pH 11. Колонку промыли водой (200 мл), и затем 0.1 M HCl. Были отобраны фракции по 40 мл, проанализированы методом ВЭЖХ с обратной фазой. Фракции 5-13, содержащие непрореагировавший (-) энантиомер субстрата объединили и довели их pH до 7.5 добавлением HCl.

Фракция 47, содержащая дезаминированный продукт, была доведена до pH 7.5 добавлением разбавленного NaOH. Анализ, проведенный методом хиральной ВЭЖХ,

показал, что этот материал это смесь, состоящая в основном из одного энантиомера (RT 10.2 мин) и другого энантиомера, (RT 8.5 мин) - побочный продукт.

(iii) Стадия (ii) была повторена в более широком масштабе. Соединение примера 1 (363 мг) в 250 мл воды инкубировали с раствором фермента (0.5 мл), полученного в стадии (i). Через 18 и соответственно 48 ч добавили еще порции по 0.5 мл раствора фермента. Реакционную смесь перемешивали в течение 70 ч, затем оставили стоять еще на 64 ч. Анализ, проведенный методом хиральной ВЭЖХ, показал, что (+) энантиомер субстрата полностью дезаминирован, и полученный раствор довели, добавляя NaOH, до pH 10.5.

Раствор, полученный выше, пропустили через ту же ОАЭ колонку и проэлюировали так же, как в стадии (i). Фракции 2-6, содержащие смесь остатков субстрата и дезаминированного продукта, были собраны. Фракции 7-13, содержащие остатки субстрата (-) энантиомер), были собраны и pH было доведено до 7.5. Фракции 25-26, содержащие дезаминированный продукт, были собраны и нейтрализованы.

Фракции 2-6 были вновь пропущены через ту же ОАЭ колонку. Фракции 3-11 из этой второй колонки содержали непрореагировавший субстрат ((-)энантиомер). Фракция 70 содержала дезаминированный продукт.

(iv) Фракции растворенного субстрата из стадий (ii) и (iii) были объединены и их pH доведено до 7.5. Раствор проэлюирован через колонку XAD-16 (40x2.4 см), упакованную в воде. Колонка была промыта водой, и затем проэлюирована смесью ацетон: вода =1:4 об/об. Фракции, содержащие (-) энантиомер BCH 189, были собраны и после сушки вымораживанием (лиофильной) был получен порошок белого цвета (190 мг).

Методы ВЭЖХ, использованные выше, соответствуют следующим параметрам:

Аналитическая ВЭЖХ с обратимой фазой:

Колонка: капиллярный патрон, Сферисорб ODS-2(5 μ M), (50x4.6 мм).

Элюент: дигидрофосфат аммония (50 mM) + 5 % MeCN.

Скорость потока: 1.5 мл/мин.

Детектор: УФ, 270 нм.

Времена удерживания: BCH-189 5.5 мин, дезаминированный BCH-189 8.1 мин.

2. Аналитическая хиральная ВЭЖХ:

Колонка: Циклобонд 1 ацетил, 250x4.6 мм.

Элюент: 0.2 % раствор триэтиламмоний ацетата (pH 7.2).

Скорость потока: 1.0 мл/мин.

Детектор: УФ, 270 нм.

Времена удерживания: BCH-189 11.0 мин и 12.5, дезаминированный BCH-189 8.5 и 10.2 мин.

(Биопревращение отслеживалось путем наблюдения за снижением пика в момент 12.5 мин и накоплением продукта в момент 10.2 мин).

Пример 5.

(-)-цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-он.

Бактериальные петли В клеток E.coli (ATCC 32848), снятые с хорошо проросших чашек с питательным агаром, были использованы для инокуляции двух колб Floence, каждая из которых содержала 250 мл питательного бульона. Культуру инкубировали при 37°C при встряхивании (250 об/мин, 5 см) в течение 18 ч. Затем содержимое этих колб было использовано для инокуляции 40 литров CDD-среды с цитидином в 70-литровом ферменте.

Условия ферментации были следующие: аэрация 40 л/мин, скорость перемешивания 750 об/мин при температуре 37°C. Три импеллера Rushton были вставлены в ферментер. Ферментационный процесс длился 18 ч, затем выращенный урожай собрали, используя центрифугу Sharpies для непрерывного центрифугирования. Клеточную пасту (вес влажный - 150 г) заморозили при -20°C, прежде чем провести разрушение клеток.

CDD Среда

	грамм/литр
L - глутаминовая кислота	3.0
MgSO ₄	0.2
K ₂ SO ₄	2.5
NaCl	2.3
NaH ₂ BO ₄	0.6
Na ₂ HPO ₄	1.1

Была приготовлена эта среда на дистиллированной воде. Простерилизована при 121°C в течение 30 мин. Цитидин (1.2 грамм/литр) был простерилизован и добавлен перед инокуляцией.

Замороженная клеточная паста (150 г) была оттаяна и суспендирована в 750 мл 100 mM HEPES (N-[2-гидроксиэтил] пиперазин-N-2-этансульфокислота]) буфере (pH = 7.5), содержащем 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (натриевая соль) и 1 mM дитиотрейтола (разрушающий буферный раствор). Клетки были разрушены в результате пропускания суспензии через Manton-Gaulin гомогенизатор под давлением 7500 фунт/дюйм² (42.102 кПа). Такая процедура была повторена трижды с охлаждением суспензии примерно до 5°C после каждого прохождения через гомогенизатор. Гомогенизат осветлили путем центрифугирования (1400 г, 60 мин). Цитидин дезаминазную активность адсорбировали на Q-сефарозной колонке (490 мг объем слоя), уравновешенной 50 mM Трис (гидроксиметил) метиламином (pH 7.5), содержащем 1 mM хлорида натрия. Собранные активные фракции (210 мл) пропустили через фенил - Сефарозную колонку (490 мл объема слоя), предварительно уравновешенную буферным раствором, содержащим 3.2 M сульфата аммония. Связанный фермент проэлюировали раствором сульфата аммония в градиенте уменьшающихся концентраций. Фракции, содержащие цитидин дезаминазную активность были собраны (695 мл), частично очищенный фермент был затем осажден 80 % сульфатом аммония. После центрифугирования (1400 г, 60 мин) гранулы ресуспендировали в 54 мл супернатантного слоя из вышеприведенной стадии и хранили при 4°C.

6.2 мл этого раствора центрифугировали (18000 г, 90 мин) и гранулы растворили в 24 мл 0.5 M калий фосфатном буфере (pH 7.5). В течение ночи систему подвергли деализу в 1M фосфатном буфере, pH 7.5. Удержанный объем был затем проэлюирован равным объемом дистиллированной воды (20 мл). К 35 мл этого раствора добавили 1 г сухих шариков Eupergit C, и смесь оставили стоять при комнатной температуре на 150-300 ч (время определялось остаточной цитидиндезаминазной активностью в растворе). Имобилизованный фермент промыли 100 mM (HCl буфером (pH 7.0), содержащим 1 mM ЭДТА), 1 мМДТТ, 0.5 NaCl и 500 частей на миллион этилового эфира параоксибензойной кислоты (буфер для хранения). Имобилизованный фермент (2.7 г влажной массы) хранили в этом буфере при 4°C до момента востребования для биотрансформации.

Продукт примера 1 (3 г) растворили в 1-литровой колбе, снабженной магнитной мешалкой, в 500 мл дистиллированной воды. Биопревращение осуществлялось при 32°C в pH-стате. pH поддерживалось постоянным при 7.0 за счет добавления 1M уксусной кислоты. 1 г влажной массы имобилизованного фермента промыли водой предварительно дистиллированной до начала реакции. За превращением следили, используя хиральную ВЭЖХ, которая показала, что предпочтительнее дезаминируется (+) энантиомер субстрата. К концу реакции (72 ч) шарики с ферментом отфильтровывали и фильтрат использовали для изоляции необходимого (-) энантиомера.

pH реакционной смеси довели до 10.5, используя для этих целей 1M сульфат аммония, и раствор нанесли на дьюлит (Duolite A113) высокополимерную смолу в OH цикле (50 мл, 0.4 объема слоя в час). Уридиновый аналог адсорбировали на полимере (смоле) и (-) энантиомер пропустили через эту смолу. Весь (-) энантиомер, оставшийся на смоле удалили промыванием 0.04 % раствором аммиака (2 объема слоя; скорость потока

0.8 объемов слоя/час).

pH прошедших растворов и промывных вод (600 мл) довели до pH 7.0, добавляя концентрированную серную кислоту, и раствор пропустили через ХАД16 смолу (50 мл, скорость потока 1.4 объема слоя/час). Колонку промыли дистиллированной водой (2.6 объема слоя, скорость потока 2 объема слоя в час), и (-) энантиомер проэлюировали смесью ацетон: вода, взятой в соотношении 1:3 (скорость потока 1.5 объема слоя в час).

Масса, содержащая фракцию (-) энантиомера (4 объема слоя) была сконцентрирована на испарителе Buchi до небольшого объема, после этого была профильтрована через стеклянный фильтр №3. Фильтрат высушили, используя лиофильную сушку, в результате получили 1.4 г продукта, название которого дано в заголовке, идентичного продукту, полученному в примере 4.

Пример 6.

Составы для таблеток.

А. Следующий состав получен путем влажной грануляции ингредиентов с раствором провидона в воде, высушивания и проверки, вслед за которой идет добавление стеарата магния и прессование.

Состав	мг/таблетка
(a) Активный ингредиент	250
(b) Лактоза Б.Ф.	210
(c) Провидон Б.Ф.	15
(d) Натрия крахмальный эликолят	20
(e) Магния стеарат	5
	500

В. Следующий состав получен непосредственным прессованием; лактоза - непосредственный компонент прессования

Состав	мг/таблетка
(a) Активный ингредиент	250
(b) Лактоза	145
(c) Авицел	100
(d) Магния стеарат	5
	500

С. (Состав с контролируемым выделением). Этот состав получен путем влажной грануляции ингредиентов с раствором провидона в воде, сушкой и скринингом, за которым следует добавление стеарата магния и прессование.

Состав	мг/таблетка
(a) Активный ингредиент	500
(b) Оксипропилметил-целлюлоза	112
(c) Лактоза Б.Ф.	53
(d) Провиден Б.Ф.	28
(e) Магния стеарат	7
	700

Пример 7.

Состав для капсул.

Состав для капсул получен путем смешения ингредиентов и заполнения этой смесью капсулы, состоящей из двух частей. Капсула изготовлена из жесткого желатина.

Состав	мг/капсула
Активный ингредиент	125

Лактоза	72.5
Авицел	50
Магния стеарат	2.5
	<hr/> 250

Пример 8.

Состав для инъекций.

Активный ингредиент 0.200 грамма, раствор гидроксида натрия, 0.1 М для доведения рН до, примерно, 11, стерильная вода до 10 мл.

Активный ингредиент суспендируют в некотором количестве воды, которая может быть подогрета, и рН доводят до, примерно, 11, раствором гидроксида натрия. Дозировку затем доводят до требуемого объема и фильтруют через стерильный градуированный мембранный фильтр в стерильную стеклянную ампулу объемом 10 мл, закупоривают стерильной пробкой и запечатывают сверху изолирующим слоем.

Пример 9.

Состав	мг/суппозиторный
Активный ингредиент	250
Твердый жир Б.Ф.	1770
	<hr/> 2020

Одну пятую часть твердого жира расплавляют в лотке, оборудованном паронагревательной рубашкой при 45°C максимум. Активный ингредиент просеивают через 200 μ М сито и добавляют к расплавленной основе при перемешивании, используя для этого мешалку с высоким сдвигом. Перемешивание ведут до тех пор, пока не будет получена однородная суспензия. Выдерживая смесь при 45°C, к ней добавляют оставшийся твердый жир и перемешивают до тех пор, пока не уверятся в образовании гомогенной смеси. Суспензию целиком пропускают через 250 μ М сито из нержавеющей стали и при непрерывном помешивании оставляют охлаждаться до 40°C. При температуре от 38 до 40°C по 2.02 г смеси помещают в подходящие 2 мл формочки из пластмассы. Суппозитории (свечи) оставляют охлаждаться до комнатной температуры.

Пример 10.

Биологическая активность.

Противовирусная активность.

Противовирусная активность соединений примера 2 была исследована в отношении трех штаммов ВИЧ-1 и одного штамма ВИЧ-2 в следующих линиях клеток.

JM клетки, полужрелые Т-клетки, полученные от больного с лимфобластозной лейкемией. Инфицировали ВИЧ-1 штамм GB8.

C8166 клетки, человеческие Т-лимфобластные клетки, инфицированные ВИЧ-1 штаммом RF.

CEM клетки, человеческие Т-лимфобластные клетки, инфицированные ВИЧ-1, штаммы RF и U455, или ВИЧ-2, штамм ROD. MT-4 клетки, человеческие Т-клетки лейкемичной клеточной линии, инфицированные ВИЧ-1, штамм RF.

Противовирусная активность в C8166, JM, и CEM клетках определяли путем ингибирования образования синцитин (Tochikura et. Al. Virology, 164, 542-546), а в MT-4 клетках - путем ингибирования превращения формазана (Bada et. al. (1987) Biochem Biophys Res Commun., 142, 128-134; Mossman (1983) J. Immun. Meth; 65, 55-57). Противовирусная активность препаратов определялась путем анализа количества ВИЧ р24 антигенов, синтезируемых в присутствии и в отсутствии энантиомеров. Результаты приведены в таблицах 1 и 2.

В. Цитотоксичность.

Цитотоксичность соединений примера 2, рацемата (BCH-189; пример 1) и 50/50 смеси двух энантиомеров определяли на пяти СД4 клеточных линиях: H9, JM, CEM, C8166 и U937.

Соединения, предназначенные для тестирования, были серийно разбавлены от 100 г/мл до 0.3 г/мл (граничные концентрации) в 96 лунках титрационных микропланшетов, 3.6×10^4 клеток было инокулировано в каждую лунку планшетов, включая контрольные, свободные от лекарства. После инкубирования при 37°C в течение 5 дней число жизнеспособных клеток было определено путем удаления клеточного образца суспензии клеток и подсчета туран голубым связанных клеток в гемоцитометре. Результаты приведены в таблице 3.

Таблица 1

Анализ	50 % Противовирусная активность 1 мг/мл					
	Формазан	Ингибирование образования цинтия				
Клетки	MT-4	CEM	CEM	CEM	JM	C8166
Вирус	HIV-1RF	HIV-2ROD	HIV-1RF	HIV-1U455	HIV-1GB8	HIV-1RF
(ВИЧ-1)	ВИЧ-1	ВИЧ-2	ВИЧ-1	ВИЧ-1	ВИЧ-1	ВИЧ-1
Диантиомер	0.28	0.045	0.07	0.006	0.03	0.05
Энантиомер	0.20	0.055	0.04	0.008	0.05	0.01

Таблица 2

Ингибирование синтеза ВИЧ p24			
50 % Ингибирование ВИЧ p24 синтеза (мг/мл)			
Клетки	C8166	JM	MT-4
Вирус	RF	GB8	RF
Энантиомер	0.021	0.033	0.0008
Энантиомер	0.016	0.016	0.0004

Таблица 3

Соединение	Цитотоксичность				
	50 % цитотоксичность (мг/мл)				
	CEM клетки	клетки	клетки	клетки	клетки
(+)-диантиомер	1	1.5	2	4	35
(-)-энантиомер	>100	30	>100	>100	>100
BCH-189	3	3.5	8	15	90
1:1 Смесь	2.5	ND*	ND	ND	ND

ND = не определено.

Формула изобретения

1. (-)-Энантиомер цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она в существенно чистом виде или его фармацевтически приемлемые производные.

2. Смесь (-)-энантиомера цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(Ш)-пиримидин-2-она и (+)-энантиомера цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она или их фармацевтически приемлемое производное, в котором (+)-энантиомер присутствует в количестве не больше, чем 5 % вес/вес.

3. Смесь по п. 2, отличающаяся тем, что (+)-энантиомер присутствует в количестве не более чем, примерно, 2 % вес/вес.

4. Смесь по п. 2, отличающаяся тем, что (+)-энантиомер присутствует в количестве не более чем примерно 1 % вес/вес.

5. Антивирусная композиция, содержащая производное 1,3-оксатиолана и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что производным 1,3-оксатиолана является (-)-энантиомер или смесь (-)-энантиомера и (+)-энантиомера цис-4-

амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она или их фармацевтически приемлемое производное по любому из пунктов 1 - 4 в эффективном количестве.

6. Антивирусная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что производным 1,3-оксатиолана является (-)-энантиомер цис-4-амино-1-(2-гидро-ксиметил-1,3-ксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она в существенно чистом виде или его фармацевтически приемлемое производное по пункту 1 в эффективном количестве.

7. Антивирусная композиция по п. 5, отличающаяся тем, что производным 1,3-оксатиолана является смесь (-)-энантиомера цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она и (+)-энантиомера цис-4-амино-1-(2-гидроксиметил-1,3-оксатиолан-5-ил)-(1H)-пиримидин-2-она или их фармацевтически приемлемое производное по любому из пунктов 2 - 4 в эффективном количестве.

8. Способ лечения млекопитающих, включая человека, страдающих от вирусной инфекции или восприимчивых к ней, включающий назначение для приема анти вирусного агента, отличающийся тем, что в качестве антивирусного агента используют антивирусную композицию по любому из пп. 5 - 7 в эффективной дозе, определяемой по содержанию производного 1,3-оксатиолана и составляющей от 0.1 до 750 мг/кг веса тела реципиента в день.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что эффективное количество антивирусной композиции составляет от 0.5 до 60 мг/кг веса тела реципиента в день.

10. Способ по п. 8, отличающийся тем, что эффективное количество антивирусной композиции составляет от 1 до 20 мг/кг веса тела реципиента в день.

11. Способ получения соединения, заявленного по п. 1, отличающийся тем, что смесь (-)-энантиомера и (+)-энантиомера подвергают хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии или энантно-селективному катаболизму, проводимому при посредстве фермента.

12. Способ получения смеси, заявленной в любом из пп. 2 - 4, отличающийся тем, что смесь (-)-энантиомера и (+)-энантиомера, содержащую более, чем 5 % вес. (+)-энантиомера, подвергают хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии или энантно-селективному катаболизму, проводимому при посредстве фермента.

13. Способ по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что для жидкостной хроматографии в качестве стационарной фазы применяют ацелированный бетациклодекстрин или триацетат целлюлозы.

14. Способ по пп. 11 или 12, отличающийся тем, что фермент применяют в иммобилизованной форме.

15. Способ по пп. 11, 12 или 14, отличающийся тем, что в качестве фермента используют цитидин-дезаминазу.

16. Способ по пп. 11, 12 или 14, отличающийся тем, что в качестве фермента используют 5'-нуклеотидазу.

17. Способ по п. 11, отличающийся тем, что смесью (-)-энантиомера и (+)-энантиомера является рацемическая смесь.

18. Способ по п. 12, отличающийся тем, что смесью (-)-энантиомера и (+)-энантиомера, содержащей более, чем 5 % вес/вес (+)-энантиомера, является рацемическая смесь.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03